PI3K 和受体型酪氨酸激酶介导家蚕麻痹肽免疫诱导信号的传递

宋　亮[1,2]，王　菲[1,2,*]，宋倩茹[1,2]，胡翠美[1,2]，化晓婷[1,2]，夏庆友[1,2]
（1. 家蚕基因组生物学国家重点实验室，重庆 400716；2. 西南大学农业部蚕桑学重点开放实验室，重庆 400716）

摘要：【目的】普遍存在于鳞翅目昆虫中的 ENF 肽具有非常相似的结构和生理功能，对昆虫的发育、免疫、应激反应等方面都起着重要的调控作用。有研究报道，作为 ENF 肽家族成员之一的家蚕 *Bombyx mori* 麻痹肽(paralytic peptide, PP)通过激活 MAPK 来调控家蚕的免疫应答，但其完整的分子作用机制尚不明确。本研究旨在解析传递家蚕 PP 免疫诱导信号的分子通路。【方法】首先通过荧光定量 PCR 检测了多种昆虫细胞系在 PP 诱导下抗菌肽基因的转录水平，并利用 Western-blot 检测 p38 MAPK 的磷酸化水平，然后利用不同信号传递分子的抑制剂处理 BmE 细胞筛选参与传递 PP 免疫诱导信号的分子。【结果】PI3K 抑制剂 LY294002 和受体型酪酸激酶抑制剂 Genistein 抑制了 PP 对 BmE 细胞抗菌肽基因表达的诱导作用；且 BmE 细胞和家蚕血细胞在 PP 的诱导下，Akt 和大小约为 70 kDa 的细胞膜蛋白均出现磷酸化水平的动态变化。【结论】PI3K/Akt 信号通路和 Genistein 敏感性的受体型酪氨酸激酶介导了 PP 免疫诱导信号的传递。

关键词：家蚕；免疫；麻痹肽；抗菌肽；MAPK；PI3K；受体型酪氨酸激酶；信号通路
中图分类号：Q966　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0454-6296(2014)02-0141-09

Paralytic peptide activates innate immunity via PI3K and receptor tyrosine kinase in silkworm (*Bombyx mori*)

SONG Liang[1,2], WANG Fei[1,2,*], SONG Qian-Ru[1,2], HU Cui-Mei[1,2], HUA Xiao-Ting[1,2], XIA Qing-You[1,2] (1. State Key Laboratory of Silkworm Genome Biology, Chongqing 400716, China; 2. Key Laboratory of Sericulture, Ministry of Agriculture, Southwest University, Chongqing 400716, China)

Abstract:【Aim】ENF peptides identified in Lepidoptera are structurally conserved and play similar roles in many physiological events, including development, immunity and stress response. It was reported that an ENF peptide from silkworm (*Bombyx mori*) referred to as paralytic peptide (PP) induces immune response through MAPK phosphorylation, whereas its molecular mechanism is still unclear. Our research aimed to investigate the signal pathways activated by PP.【Methods】The response of different insect cell lines to PP was evaluated by fluorescent quantitative PCR, and the BmE cell lines in response to PP were screened based on the phosphorylation level of p38 MAPK analyzed by Western blot under the induction of PP. Then inhibitors against a variety of signaling pathways were applied to the BmE cells to screen the molecules involved in signal transmission.【Results】The activity of PP in stimulating anti-microbial peptide (AMP) production in BmE cells was abrogated by PI3K inhibitor LY294002 or receptor tyrosine kinase inhibitor Genistein. Furthermore, the dynamic phosphorylation of Akt and certain plasma membrane protein with a molecular mass of 70 kDa in BmE cells and hemocytes was observed in the course of PP stimulation.【Conclusion】PP induces the expression of AMPs via PI3K/Akt signaling pathway, and Genistein-sensitive receptor tyrosine kinase is also involved in this immunological activity of PP.

Key words: *Bombyx mori*; immunity; paralytic peptide; anti-microbial peptide; MAPK; PI3K; receptor tyrosine kinase; signaling pathway

构成昆虫先天免疫系统的多种分子在进化上具有高度保守性，在不同种属的昆虫甚至在脊椎动物

基金项目：国家“973”计划项目(2012CB114600)；国家自然科学基金青年科学基金项目(31201854)
作者简介：宋亮，男，1986 年生，山西长治人，博士研究生，研究方向为家蚕分子免疫学，E-mail：songliang308@126.com
* 通讯作者 Corresponding author, E-mail：fwangswu@gmail.com
收稿日期 Received：2013-11-13；接受日期 Accepted：2014-02-07

中都发挥着相似的功能，例如肽聚糖识别蛋白（peptidoglycan recognition protein，PGRP）或革兰氏阴性菌结合蛋白（gram-negative bacteria binding protein，GNBP）等分子识别入侵机体的微生物，激活 NF-κB 信号通路，机体最终以产生多种具有抗菌活性的分子，如溶菌酶和抗菌肽等作为有效的免疫防御方式（Okada and Natori，1985）。昆虫体内还存在一些活性短肽，虽然与脊椎动物的细胞因子在一级结构上不具有同源性，但是对昆虫的体液或细胞免疫以及多种生理活动起着重要的调控作用，被称为“类细胞因子”，如作为昆虫 JAK/STAT 信号通路配体的 Udp（Unpaired）家族成员（Agaisse *et al.*，2003），以及在鳞翅目昆虫中普遍存在的 ENF 肽（Ohnishi *et al.*，1995；Strand *et al.*，2000）。具有生物学活性的 ENF 肽是由无活性的前体被血淋巴中的丝氨酸蛋白酶剪切后生成的，长度为 23 或 25 aa（Nakahara *et al.*，2003；Ishii *et al.*，2008）。它们在 N 端有其特征序列 ENF，并具有 C-x（2）-G-x（4，6）-G-x（1，2）-C 这样的基序，且此基序与哺乳动物表皮生长因子（epithelial growth factor，EGF）家族成员所共有的基序相似，因此 ENF 肽在空间结构上与 EGF 的 C 端具有相似性（Yu *et al.*，1999；Ohnishi *et al.*，2001；Aizawa *et al.*，2002；Miura *et al.*，2002）。根据 ENF 肽在不同物种中被发现时的功能对其命以不同的名称，例如在粘夜蛾 *Pseudaletia separata* 中它具有抑制幼虫生长的作用，被命名为生长阻抑肽（growth blocking peptide，GBP）（Hayakawa，1995）；在大豆尺蠖 *Pseudoplusia includens* 中具有刺激浆细胞延展的功能，被命名为促浆细胞延展肽（plasmatocyte spreading peptide，PSP）（Clark *et al.*，1997）；在家蚕 *Bombyx mori* 中，则具有导致幼虫瘫痪的麻痹功能，因此被命名为麻痹肽（paralytic peptide，PP）（Ha *et al.*，1999）。虽然名称不同，但实际上 ENF 肽的生物学活性极其相似，尤其在免疫应答方面，它们的作用主要表现为促进浆细胞的延展和诱导多种免疫相关分子的表达，其中包括和吞噬作用相关的细胞膜蛋白（如 Tetraspanin E 和 Ced-6）、丝氨酸蛋白酶（Scolexin）、抗菌肽（Cecropin A 和 Moricin）以及病原体识别分子 BmPGRP-S2 等，从而激活昆虫的细胞和体液免疫（Ishii *et al.*，2010）。

对 ENF 肽分子作用机制的研究发现，家蚕 PP 诱导脂肪体和肠道 NO 的产生从而激活 p38 MAPK 途径来调节体液和细胞免疫应答（Ishii *et al.*，2013），甘蓝夜蛾 *Mamestra brassicae* 的 GBP 则通过激活脂肪体细胞系 MaBr4 中的 PLC 从而激活 ERK 以及导致 Ca^{2+} 的内流来诱导酪氨酸羟化酶（tyrosine hydroxylase，TH）和多巴脱羧酶（dopa decarboxylase，DCC）的产生（Ninomiya *et al.*，2008），GBP 还导致细胞膜衔接蛋白 p77 的酪氨酸磷酸化从而激活整联蛋白（integrin）使粘夜蛾浆细胞得以延展（Oda *et al.*，2010）。尽管不同的研究表明 MAPK 信号通路参与了 ENF 肽的免疫诱导作用，但其他信号传递分子，尤其是 MAPK 信号通路上游的分子以及 ENF 肽的受体尚未确定，需要更进一步的研究来解析其完整的信号通路。

家蚕作为鳞翅目昆虫的模式生物，其较为完善的基因组、蛋白质组信息以及较成熟的实验技术，为系统性地研究 ENF 肽免疫功能的分子机制提供了良好的条件。为更便于在细胞与分子水平上研究家蚕 PP 的信号通路，本研究首先鉴定了一种对 PP 诱导产生免疫应答的细胞模型，然后在此模型的基础上利用抑制剂对信号传导分子进行筛选，确定了 PI3K/Akt 和对 Genistein 敏感性的受体型酪氨酸激酶参与 PP 对抗菌肽表达的诱导作用。

1 材料和方法

1.1 试虫、BmE 细胞与主要试剂

家蚕品种为大造，由西南大学家蚕基因库提供。BmE 细胞为家蚕胚胎细胞（Pan *et al.*，2007），由本实验室培养和保存。

主要试剂：RNase 抑制剂和 M-MLV 反转录酶购自 Invitrogen 公司，Total RNA Kit 购自 OMEGA 公司，DEPC 水购自碧云天公司，荧光定量 PCR 相关试剂与器材分别购自 TaKaRa 和 ABI 公司，p38 MAPK 磷酸化抗体和 P-Tyr-110 抗体购于 Cell Signaling 公司，Akt1/2/3 和 p-Akt1/2/3（Ser473）抗体购于 Santa Cruz 公司，家蚕 PP（GenBank 登录号为：AB511038.1）由吉尔生化（上海）有限公司化学合成，并在 C-端予以生物素修饰（ENFVGGCATGFKRTADGRCRPIF-K-biotin，Biotin-PP）（Ohnishi *et al.*，2001）。

1.2 注射家蚕和体外诱导家蚕血细胞

选取大小一致的 5 龄第 3 天家蚕，用毛细管在气孔处注射 Biotin-PP（0.5 ng/μL，5 ng/头）。在注射后不同时间点分别解剖 3 头家蚕，剥离脂肪体用于 RNA 提取。收集 5 龄第 3 天家蚕的血淋巴，4℃

500 g 离心 1 min 后分离得到家蚕血淋巴细胞并置于 12 孔细胞培养板中用无抗生素、无血清的 Grace 培养基在 27℃下培养，每孔约 4 头家蚕的血细胞，待细胞生长状态良好后，在培养基中添加不同浓度的 Biotin-PP 予以诱导，经不同诱导时间后收集细胞用于 RNA 提取。

1.3　BmE 细胞培养和诱导

在 27℃条件下，用含 10% 胎牛血清的 Grace 培养基培养 BmE 细胞。进行诱导实验前，更换为新鲜培养基，并添加 PP 或抑制剂，经不同诱导时间后收集细胞用于 RNA 提取。

1.4　荧光定量 PCR 检测免疫相关基因的表达

对收集的样品提取 RNA 后，用反转录试剂盒合成 cDNA。根据检测基因的 CDS 序列设计荧光定量 PCR 引物（表 1），以 sw22934 作为参比基因。按照 SYBR® Premix Ex Taq™ 说明书上的方法，每个反应设置 3 个样品重复，用 ABI 7500 Fast (Applied Biosystems) 荧光定量 PCR 仪进行定量检测(qRT-PCR)，每个实验至少重复 3 次。

表 1　本研究所用引物列表

Table 1　Primers used in this study

基因名称 Gene	引物序列（5′-3′） Primer sequences
BmCecropin A	F：TTGAGCTTCGTCTTCGCGTT
	R：TTGCGTCCCACTTTCTCAATT
BmMoricin	F：CCGCTCCAGCAAAATACCT
	R：TTGAAAACATCGTTGGCTGT
BmAttacin	F：GTGTAGCGTTGTTGTTGTT
	R：AGGTTCCATCCGAGTTCA
BmGlover B	F：GGCTGCTATTGACTTGAAC
	R：TCTGTGACCGAACTCCTT
BmTetraspanin E	F：CAGCGTCCTCCTCTTCACCT
	R：CCTCGTCTGCGTTAGCGTC
BmCed-6	F：GGACGGTGTTGCCATACAGG
	R：TTATCGTCCGCGCAGTACG

1.5　BmE 细胞膜蛋白和细胞总蛋白的提取

细胞总蛋白的提取方法：去除细胞培养基后，用 PBS 清洗细胞 3 次，加入预冷的细胞裂解液(100 mmol/L Hepes-NaOH，300 mmol/L NaCl，3 mmol/L $MgCl_2$，1 mmol/L EDTA，20% 甘油，2% TX-100 (w/v)，1% sodium deoxycholate，0.2% SDS，pH 7.5)，冰上孵育 30 min，17 000 g，4℃离心 15 min，收集上清。细胞膜蛋白的提取方法参考(Wang *et al*., 2009)中的报道。用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度。

1.6　Western-blot 检测

对提取的蛋白样品，按等量上样进行 12% SDS-PAGE 电泳，然后将蛋白转移到 PVDF 膜上，用 5% 的 BSA 封闭 1 h 后，用相应的一抗 4℃孵育过夜，TBST 清洗 3 次后用对应的二抗室温孵育1 h，再用 TBST 清洗 5 次，然后用 ECL 化学发光检测试剂盒显色，实验重复 3 次。

1.7　数据分析

荧光定量 PCR 采用相对定量法进行计算，依据各样品中的目标基因和内参基因的临界循环数(Ct)值，利用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算分析。所有的数据都采用平均值 ± 标准差(*SD*)予以表述。数据显著性分析采用 Student 氏 *t* 检验，$P < 0.05$ 具有显著性差异，$P < 0.01$ 具有极显著性差异。荧光定量 PCR 检测和 Western-blot 检测实验至少重复 3 次，结果一致，文中展示其中一次实验结果作为代表。

2　结果与分析

2.1　化学合成的家蚕麻痹肽(Biotin-PP)的活性检测

为方便后续研究的开展，在化学合成 PP 的时候对其 C-端予以了生物素修饰。虽然文献报道 C-端生物素修饰的 ENF 肽仍然具有使浆细胞延展、细胞增殖、幼虫发育迟缓和麻痹的作用(Ohnishi *et al*., 2001)，但其免疫诱导机制与未修饰的 ENF 肽是否一致还需要实验的确认，因此我们对其活性予以了检测。向家蚕体腔注射 Biotin-PP 后，在不同时间点取家蚕脂肪体定量检测抗菌肽基因的表达(图 1：A，B)。注射 Biotin-PP 3 h 后，家蚕脂肪体中抗菌肽基因 *cecropin A* 和 *moricin* 的转录水平较注射 PBS 的对照组都有显著的升高。取家蚕血淋巴细胞用 Biotin-PP 在体外诱导不同时间，对吞噬相关基因的转录水平也进行了定量检测(图 1：C，D)。Biotin-PP 诱导 3 h 或 6 h 后，*ced*-6 和 *tetraspanin E* 基因的转录水平较对照也都有显著的升高，其中 *ced*-6 基因的转录水平在诱导 6 h 后达到对照的 2 倍左右。对 Biotin-PP 免疫活性的检测结果显示，该合成的多肽对脂肪体和血淋巴细胞均具有诱导作用，并且与 Ishii 等(2010)的报道基本一致，表明该分子能够激活家蚕的体液免疫和细胞免疫，可以用于 PP 免疫应答信号通路的研究。

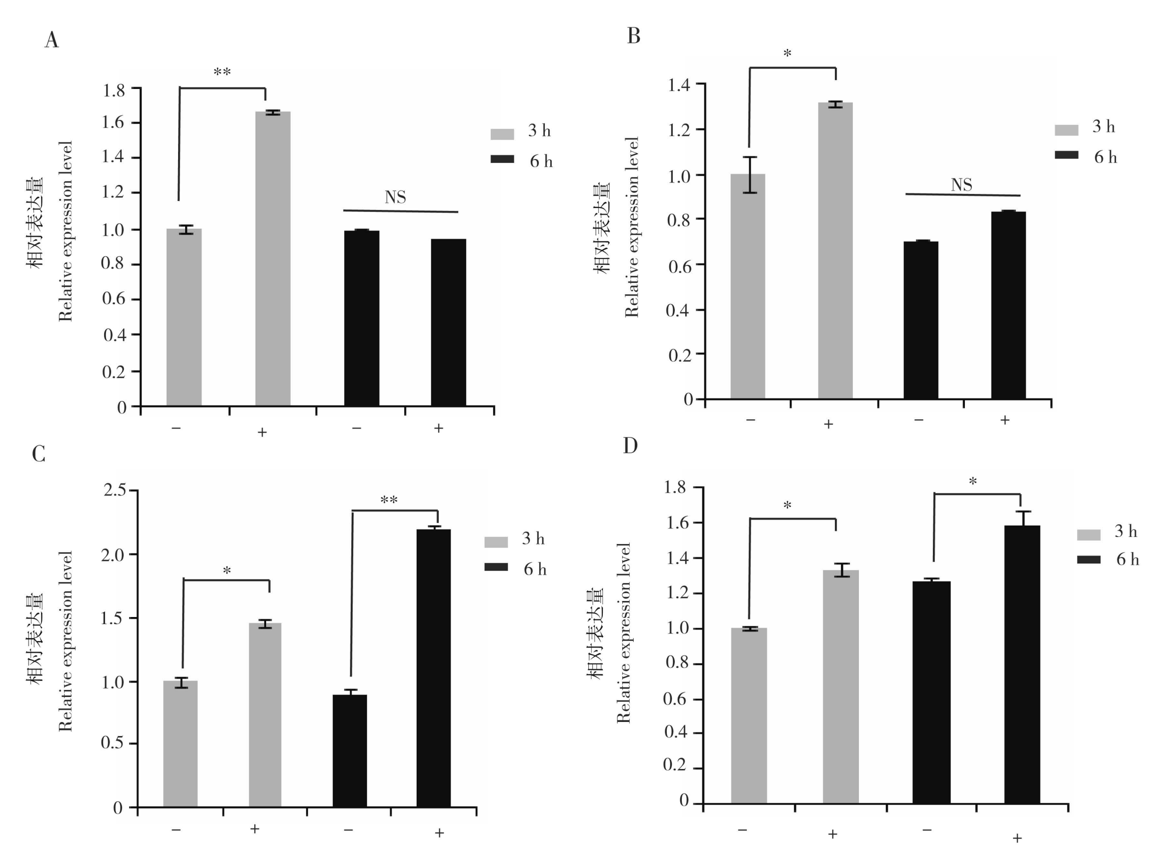


图 1 Biotin-PP 诱导家蚕脂肪体和血细胞中免疫相关基因的表达

Fig. 1 Induction of immune-related genes by Biotin-PP in silkworm fat body and hemocytes

A, B：往家蚕体内注射 5 ng Biotin-PP 后，定量 PCR 检测脂肪体中抗菌肽基因 *cecropin A*（A）和 *moricin*（B）的转录水平 q-PCR analysis of *cecropin A*（A）and *moricin*（B）transcriptional level in fat body from silkworm larvae after injection of 5 ng Biotin-PP；C, D：用 200 ng/mL 的 Biotin-PP 体外诱导家蚕血细胞后，定量 PCR 检测吞噬作用相关基因 *ced-6*（C）和 *tetraspanin E*（D）的转录水平变化 q-PCR analysis of *ced-6*（C）and *tetraspanin E*（D）transcriptional level in hemocytes induced by 200 ng/mL Biotin-PP *ex vivo*. +：注射 Biotin-PP Injection of Biotin-PP；−：注射 PBS Injection of PBS. 图中数据为平均值 ± 标准差，柱上单星号和双星号分别表示处理组和对照组之间在 0.05 和 0.01 水平上显著差异，NS 表示在 0.05 水平差异不显著（*t* 检验）；图 2, 3 同。All values in the figure are represented as mean ± *SD*, the single asterisk and double asterisks indicate significant difference at the 0.05 and 0.01 level（*t* test）, respectively, and NS indicates no significant difference at the 0.05 level. The same for Figs. 2 and 3.

2.2 家蚕麻痹肽免疫应答细胞模型的确定

建立和利用易于操作、重复性好的细胞系来代替家蚕个体进行分子机制的研究，将有助于深入解析家蚕 PP 的免疫应答信号通路。我们对包括 BmE, Sf9, Spli221 和 BmN 在内的多种昆虫细胞系用 Biotin-PP 进行了体外诱导，并通过 qRT-PCR 检测抗菌肽的变化来筛选对 Biotin-PP 产生免疫应答的细胞系。实验结果显示，只有 BmE 细胞在 Biotin-PP 的诱导下，抗菌肽基因 *attacin* 和 *glover B* 的表达量有显著的升高（图 2：A, B），且 *attacin* 的转录水平在中低浓度 Biotin-PP 诱导 3 h 和 12 h 时表现出剂量依赖效应，表明该细胞对 PP 产生了应答。有研究报道 PP 的诱导使家蚕脂肪体 p38 MAPK 的磷酸化水平升高，为检测 BmE 细胞是否具有相同的分子应答，本研究利用磷酸化 MAPK 的特异性抗体（Gu *et al.*, 2011）通过 Western-blot 检测了 Biotin-PP 诱导下的 BmE 细胞中 p38 MAPK 磷酸化水平的变化（图 2：C）。结果显示 p38 MAPK 的磷酸化水平在诱导后逐渐增强，并在 5 min 时达到最高，继而随着诱导时间的延长逐渐减弱，该磷酸化的动态变化表明 Biotin-PP 激活了 p38 MAPK 信号通路。以上实验结果表明 Biotin-PP 启动了 BmE 细胞的免疫应答并且激活了 p38 MAPK 信号通路，因此该细胞系可以作为研究家蚕 PP 体液免疫信号通路的细胞模型。

2.3 参与家蚕麻痹肽免疫信号传递通路的分子的筛选

为筛选参与 PP 信号通路的相关分子，各种信

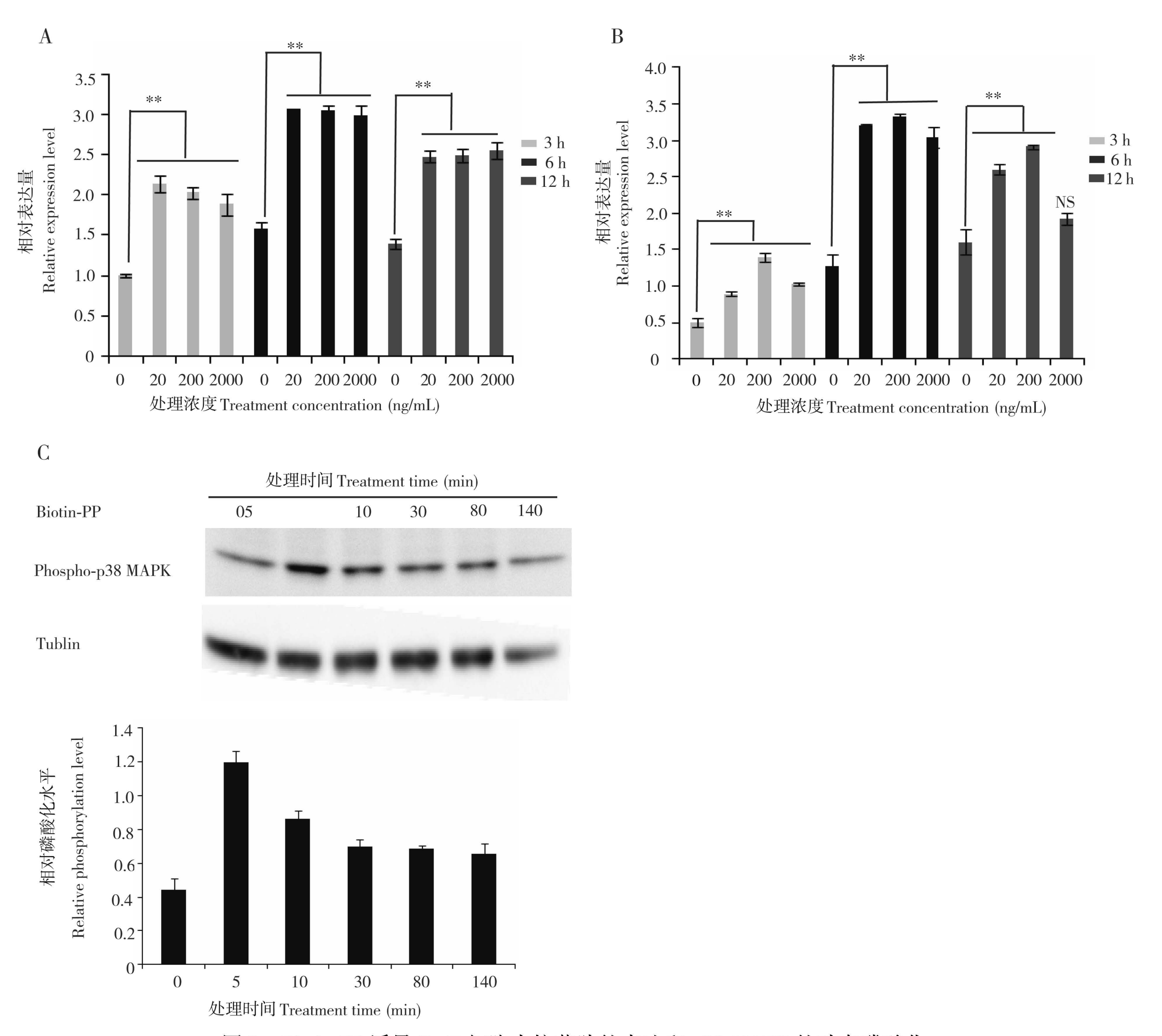


图 2　Biotin-PP 诱导 BmE 细胞中抗菌肽的表达和 p38 MAPK 的动态磷酸化

Fig. 2　Expression of AMP and dynamic phosphorylation of p38 MAPK induced by Biotin-PP in BmE cells

A，B：用不同浓度 Biotin-PP 诱导 BmE 细胞后，定量 PCR 检测抗菌肽 *attacin*（A）和 *glover B*（B）基因的转录水平变化 q-PCR analysis of *attacin*（A）and *glover B*（B）transcriptional level in BmE cells induced by Biotin-PP at different concentrations；C：Western-blot 检测在不同诱导时间点 BmE 细胞中 p38 MAPK 的磷酸化水平，用各诱导时间点 Tublin 蛋白的蛋白量均一化，p38 MAPK 磷酸化水平并以 0 min 的 p38 MAPK 相对磷酸化水平作为参照 Western-blot analysis of p38 MAPK phosphorylation after BmE cells were induced by Biotin-PP at various time points as indicated，the phosphorylation intensity of p38 MAPK was normalized to the level of tublin and annotated as mean fold increase（± *SD*）over the normalized phosphorylation intensity at 0 min after induction.

号传递分子的抑制剂，如受体型酪氨酸激酶的抑制剂 Genistein、PI3K 的抑制剂 LY294002、PKC 的抑制剂 Staurosporine 、Src 的抑制剂 SU6656 等，与 Biotin-PP 共同诱导 BmE 细胞 6 h 后，定量检测抗菌肽基因 *attacin* 和 *glover B* 的表达水平变化。结果显示，随着浓度增加，Genistein 对 Biotin-PP 诱导抗菌肽基因表达的抑制效果逐渐增强，在高浓度(50 或 100 μmol/L)抑制剂存在的情况下抗菌肽的表达几乎难以检测(图 3：A，B)；LY294002 同样抑制了 Biotin-PP 对抗菌肽的诱导表达且对 *glover B* 的表达抑制存在剂量依赖性(图 3：C，D)。而其他几种抑制剂对 PP 的诱导作用影响不明显或实验重复性较差无法分析其规律性(结果未显示)。通过抑制剂筛选实验，我们推测 BmE 细胞中受体型酪氨酸激酶和 PI3K 可能参与了家蚕 PP 的免疫应答信号通路。

2.4　PP 免疫应答信号分子活性检测

由上述实验可推测家蚕 PP 免疫诱导功能的实现需要 Genistein 敏感性的受体型酪氨酸激酶的介导，我们推测位于细胞膜上的某未知受体型酪氨酸激酶可能通过磷酸化参与了 PP 的免疫应答信号通路，因此对经 Biotin-PP 诱导后的 BmE 细胞膜蛋白的酪氨酸磷酸化水平进行了检测。利用酪氨酸磷酸化抗体经 Western-blot 检测发现，大小约 70 kDa 的细胞膜蛋白(p70)在细胞经 Biotin-PP 诱导后出现了酪氨酸磷酸化的动态变化，即在诱导后 1 min 磷酸化水平达到最高，且此磷酸化水平能持续到5 min，之后随着诱导时间的延长逐渐减弱(图 4：A)。该结果说明 p70 通过酪氨酸磷酸化参与了 Biotin-PP 的免疫应答信号通路。p70 为受体型酪氨酸激酶还是作为衔接蛋白被受体型酪氨酸激酶所活化，还需要进一步的鉴定。

为进一步确定 PI3K 信号通路介导了 PP 免疫诱导信号的传递，我们对 PI3K 下游的一个关键信号分子——Akt 的磷酸化水平进行了检测。经 Biotin-PP 诱导后，BmE 细胞和家蚕血细胞中 Akt 磷酸化水平逐渐增强，并分别在 15 min 和 2 min 时达到最高，之后随着诱导时间的延长，磷酸化水平逐渐减弱(图 4：B，C)。该实验结果表明 PI3K/Akt 参与了 PP 的免疫诱导信号通路，并且在 BmE 细胞和家蚕血细胞中的诱导活化模式类似。

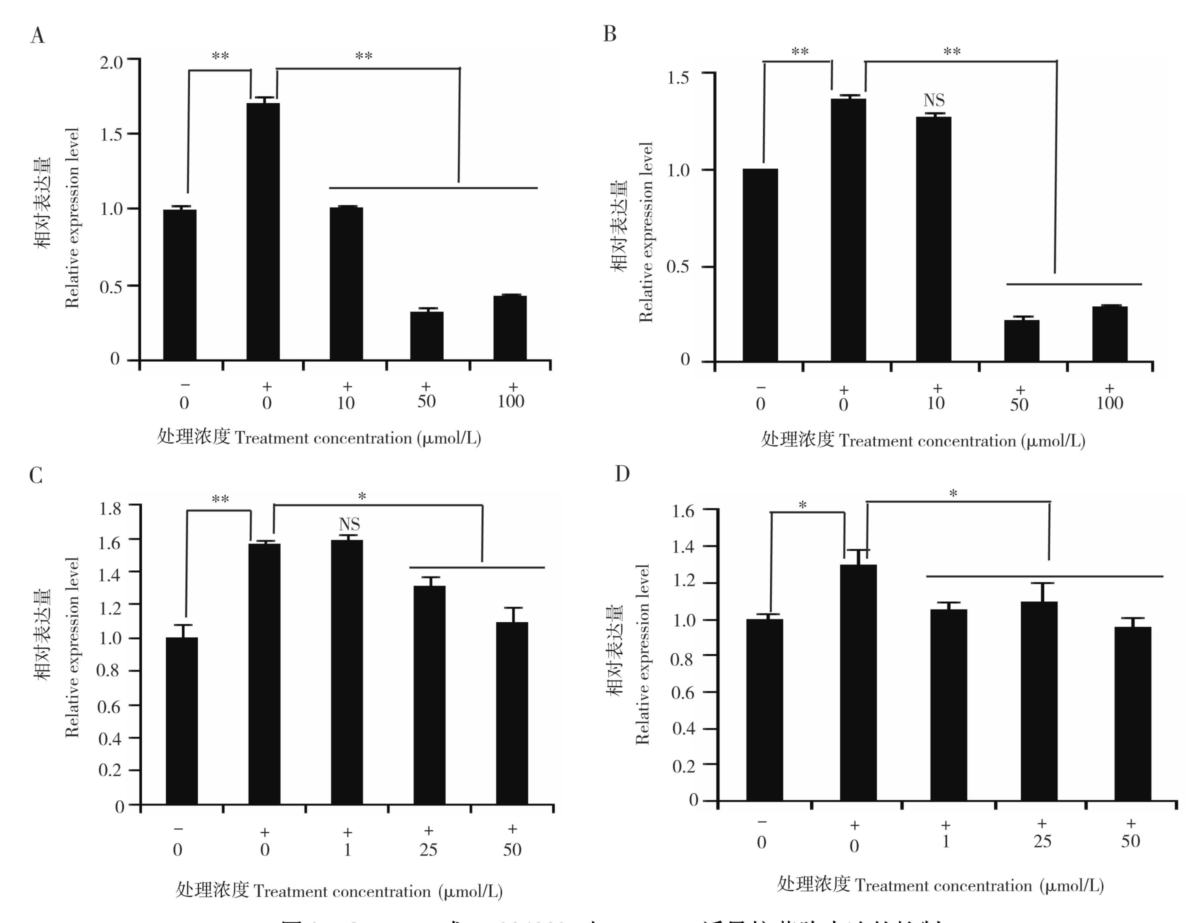


图 3　Genistein 或 LY294002 对 Biotin-PP 诱导抗菌肽表达的抑制

Fig. 3　Inhibition of Biotin-PP in inducing AMP expression by Genistein or LY294002

A，B：不同浓度的 Genistein 和200 ng/mL Biotin-PP 共同诱导 BmE 细胞6 h 后，定量 PCR 检测抗菌肽基因 *glover B* (A)和 *attacin* (B)的转录水平变化 q-PCR analysis of *glover B* (A) and *attacin* (B) transcriptional level in BmE cells induced by Biotin-PP in the presence of Genistein at different concentrations for 6 h；C，D：不同浓度的 LY294002 和200 ng/mL Biotin-PP 共同诱导 BmE 细胞6 h 后，定量 PCR 检测抗菌肽基因 *glover B* (C)和 *attacin* (D)的转录水平变化 q-PCR analysis of *glover B* (C) and *attacin* (D) transcriptional level in BmE cells induced by Biotin-PP in the presence of LY294002 at different concentrations for 6 h.

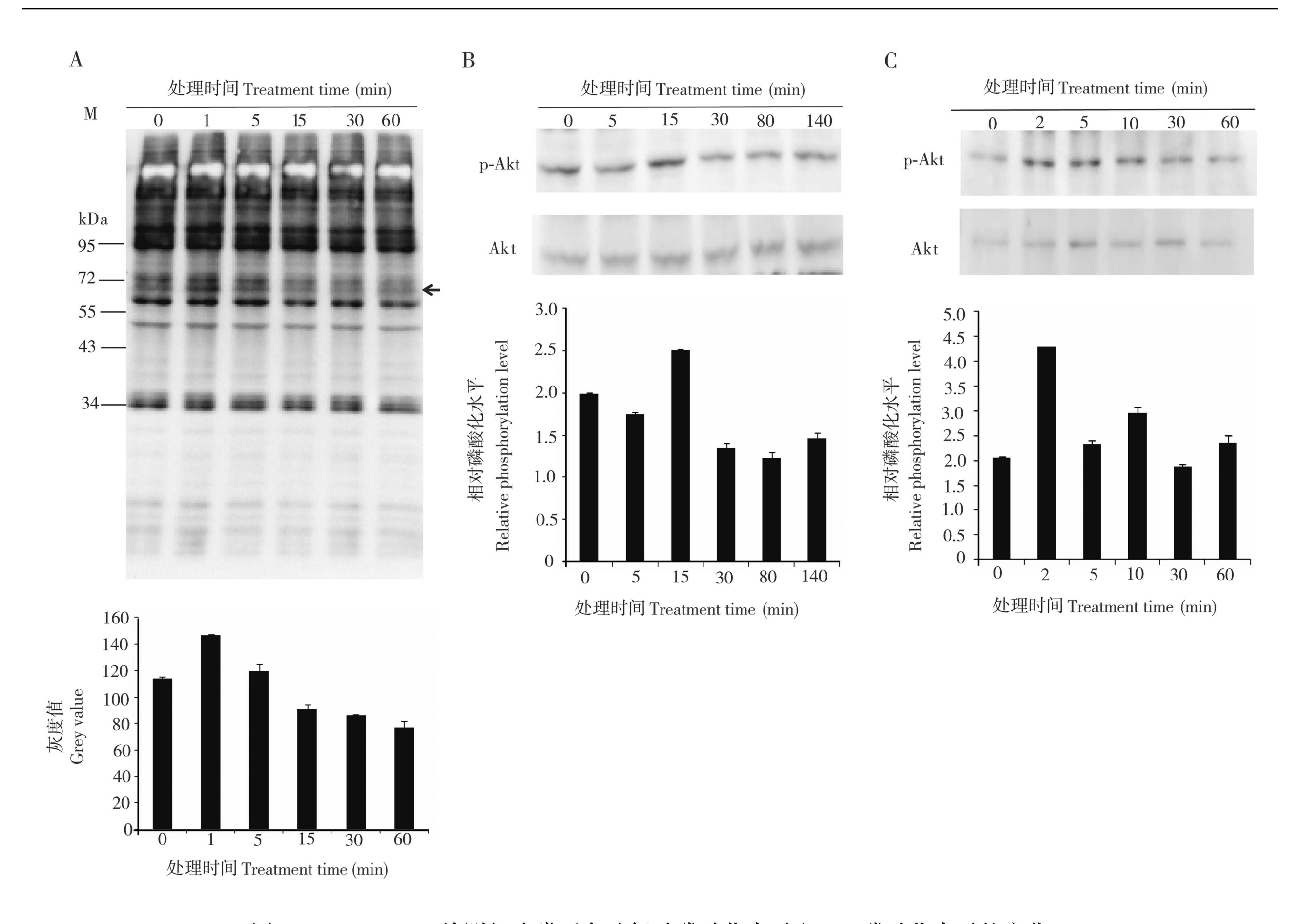


图 4　Western-blot 检测细胞膜蛋白酪氨酸磷酸化水平和 Akt 磷酸化水平的变化

Fig. 4　Western-blot analysis of the phosphorylation of plasma membrane protein and Akt

A：经 200 ng/mL Biotin-PP 诱导不同时间后，Western-blot 检测 BmE 细胞膜蛋白酪氨酸磷酸化的水平，对在此过程中出现磷酸化水平动态变化的膜蛋白条带进行灰度值分析并用箭头指示 Western-blot analysis of the phosphorylation of plasma membrane protein from BmE cells induced by 200 ng/mL Biotin-PP at various time points as indicated, the arrow indicates plasma membrane protein with dynamic phosphorylation in the time course which was quantitated by using grey values; B，C：经 200 ng/mL Biotin-PP 诱导不同时间后，Western-blot 检测 BmE 细胞（B）和家蚕血细胞（C）中 Akt 的磷酸化水平，用各诱导时间点 Akt 总蛋白量均一化 Akt 磷酸化水平并以 0 min 的 Akt 相对磷酸化水平作为参照 Western-blot analysis of Akt phosphorylation in BmE cells (B) and hemocytes (C) induced by 200 ng/mL Biotin-PP at various time points as indicated, the phosphorylation intensity of Akt was normalized to the level of total Akt and annotated as mean fold increase (± *SD*) over the normalized phosphorylation intensity at 0 min after induction.

3　讨论

细胞系在探索信号通路和分子调控机制的研究中应用广泛，例如，以果蝇 S2 细胞作为研究系统模型，通过全基因组 RNA 干涉筛选出参与吞噬白色念珠菌的相关分子（Stroschein-Stevenson *et al.*, 2006）；将果蝇 S3 细胞系作为模型，对磷酸肌醇信号通路进行了深入的研究（Zhou *et al.*, 2012）。对于家蚕 PP 免疫诱导分子机制的研究，如果在昆虫个体水平上或离体培养的组织上开展将更贴近真实的生理状况，但也存在很多不利因素，例如操作复杂、取材不方便且干扰因素多导致一致性较差等，因此在易操作易重复的细胞水平上研究其信号通路更为可行，并能为个体上的研究提供依据和参考。在本研究中，为筛选和鉴定一个对 PP 产生免疫应答的细胞系，我们检测了不同昆虫细胞系在经 PP 诱导后抗菌肽基因的转录水平和 p38 MAPK 的磷酸化水平。经比较发现，BmE 细胞中抗菌肽基因 *attacin* 和 *glover B* 的转录水平在 PP 诱导后显著升高，且 p38 MAPK 分子表现出动态磷酸化，说明 BmE 细胞中存在应答 PP 的分子元件，且与个体水平具有相似性，可作为研究 PP 信号通路的模型。但在 BmE 细胞中并未能检测到抗菌肽基因 *cecropin A* 和 *moricin* 的转录水平变化或吞噬作用相关基因 *ced-6* 和 *tetraspanin E* 的表达，这表明细胞系与个体

仍然存在一些差异，尤其在信号通路针对的靶标基因上有所不同，且 BmE 细胞不是研究细胞免疫的理想模型。

要对家蚕 PP 免疫应答信号通路和分子机制进行系统的解析，其关键在于鉴定家蚕 PP 的细胞膜受体或者其衔接分子。对 ENF 肽受体的研究发现，EGF 和 GBP 都具有促进 Sf9 细胞增殖的功能，同时二者都能够使 Sf9 细胞膜上分子量大小约为 58 kDa 的蛋白质（p58）酪氨酸磷酸化；免疫共沉淀实验发现分子量约为 60 kDa 的蛋白质（p60）可能是结合 GBP 的分子，因此推测 GBP 的受体可能是以二聚体的形式存在，其中一个亚基（p60）结合 GBP，另一个亚基（p58）通过磷酸化传递信号，但是此蛋白并没有得到鉴定（Ohnishi *et al*., 2001）。在粘夜蛾中，通过检测在 GBP 诱导下浆细胞膜蛋白酪氨酸磷酸化的差异，鉴定到一个作为 GBP 衔接蛋白的细胞膜蛋白（p77）（Oda *et al*., 2010），但在家蚕中不存在此蛋白的同源分子。本研究观测到受体型酪氨酸激酶抑制剂抑制了 PP 对抗菌肽基因表达的诱导作用，并经过进一步的实验发现大小约 70 kDa 的细胞膜蛋白在 PP 诱导过程中表现出动态的酪氨酸磷酸化，因此推测该蛋白有可能作为 PP 的受体或受体的衔接蛋白在 PP 免疫应答信号通路中发挥功能。如果此蛋白能够通过质谱等手段予以鉴定，这将有助于我们对昆虫类细胞因子信号通路的完整认识。另外，本研究确定了 PI3K/Akt 参与 PP 免疫诱导信号的传递，而 PI3K/Akt 的激活通常有赖于 G 蛋白偶联受体（G-protein coupled receptor, GPCR）或受体型酪氨酸激酶（Sorkin and von Zastrow, 2009; López-Sánchez *et al*., 2013），那么在磷酸化发生时序上细胞膜蛋白（最大磷酸化水平发生在 PP 诱导后 1 min）早于 Akt（最大磷酸化水平发生在 PP 诱导后 10 min 左右）这一现象是否暗示了 PI3K/Akt 是由受体型酪氨酸激酶所激活？且 PI3K/Akt 信号通路与已经被报道的 MAPK 信号通路是作为两条独立的 PP 免疫诱导信号传递方式，还是存在上下游关系，也需要做更深一步的探索。

近年来在包括双翅目、鞘翅目、膜翅目和半翅目的昆虫中也陆续发现了具有 C-x(2)-G-x(4, 6)-G-x(1, 2)-C 基序的短肽，它们虽然没有 ENF 这样的特征序列，但它们的功能和 ENF 家族成员类似（Matsumoto *et al*., 2012）。对这些"类 ENF 肽"的研究工作近期才开展起来，例如在果蝇中鉴定到的类 GBP 分子，能提高抗菌肽的表达水平，且此免疫诱导功能不依赖于经典的 Toll 和 IMD 信号通路，这一发现和 PP 对家蚕的免疫调控机制一致；同时研究也提出 GBP 可能通过 JNK 信号途径行使其功能（Tsuzuki *et al*., 2012）。对这些具有免疫诱导活性的分子进行功能解析，将从一个崭新的角度帮助我们全面了解昆虫的生理活动。

参考文献（References）

Agaisse H, Petersen UM, Boutros M, Mathey-Prevot B, Perrimon N, 2003. Signaling role of hemocytes in *Drosophila* JAK/STAT-dependent response to septic injury. *Dev. Cell*, 5(3): 441–450.

Aizawa T, Hayakawa Y, Nitta K, Kawano K, 2002. Structure and activity of insect cytokine GBP which stimulates the EGF receptor. *Mol. Cells*, 14(1): 1–8.

Clark KD, Pech LL, Strand MR, 1997. Isolation and identification of a plasmatocyte-spreading peptide from the hemolymph of the Lepidopteran insect *Pseudoplusia includens*. *J. Biol. Chem.*, 272(37): 23440–23447.

Gu SH, Young SC, Tsai WH, Lin JL, Lin PL, 2011. Involvement of 4E-BP phosphorylation in embryonic development of the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Insect Physiol.*, 57(7): 978–985.

Ha SD, Nagata S, Suzuki A, Kataoka H, 1999. Isolation and structure determination of a paralytic peptide from the hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*. *Peptides*, 20(5): 561–568.

Hayakawa Y, 1995. Growth-blocking peptide: an insect biogenic peptide that prevents the onset of metamorphosis. *J. Insect Physiol.*, 41(1): 1–6.

Ishii K, Adachi T, Hamamoto H, Oonishi T, Kamimura M, Imamura K, Sekimizu K, 2013. Insect cytokine paralytic peptide activates innate immunity via nitric oxide production in the silkworm *Bombyx mori*. *Dev. Comp. Immunol.*, 39(3): 147–153.

Ishii K, Hamamoto H, Kamimura M, Nakamura Y, Noda H, Imamura K, Mita K, Sekimizu K, 2010. Insect cytokine paralytic peptide (PP) induces cellular and humoral immune responses in the silkworm *Bombyx mori*. *J. Biol. Chem.*, 285(37): 28635–28642.

Ishii K, Hamamoto H, Kamimura M, Sekimizu K, 2008. Activation of the silkworm cytokine by bacterial and fungal cell wall components via a reactive oxygen species-triggered mechanism. *J. Biol. Chem.*, 283(4): 2185–2191.

López-Sánchez I, Garcia-Marcos M, Mittal Y, Aznar N, Farquhar MG, Ghosh P, 2013. Protein kinase C-theta (PKCθ) phosphorylates and inhibits the guanine exchange factor, GIV/Girdin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 110(14): 5510–5515.

Matsumoto H, Tsuzuki S, Date-Ito A, Ohnishi A, Hayakawa Y, 2012. Characteristics common to a cytokine family spanning five orders of insects. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 42(6): 446–454.

Miura K, Kamimura M, Aizawa T, Kiuchi M, Hayakawa Y, Mizuguchi M, Kawano K, 2002. Solution structure of paralytic peptide of silkworm, *Bombyx mori*. *Peptides*, 23(12): 2111–2116.

Nakahara Y, Kanamori Y, Kiuchi M, Kamimura M, 2003. Effects of silkworm paralytic peptide on in vitro hematopoiesis and

plasmatocyte spreading. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 52(4): 163-174.

Ninomiya Y, Kurakake M, Oda Y, Tsuzuki S, Hayakawa Y, 2008. Insect cytokine growth-blocking peptide signaling cascades regulate two separate groups of target genes. *FEBS J.*, 275(5): 894-902.

Oda Y, Matsumoto H, Kurakake M, Ochiai M, Ohnishi A, Hayakawa Y, 2010. Adaptor protein is essential for insect cytokine signaling in hemocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107(36): 15862-15867.

Ohnishi A, Hayakawa Y, Matsuda Y, Kwon KW, Takahashi TA, Sekiguchi S, 1995. Growth-blocking peptide titer during larval development of parasitized and cold-stressed armyworm. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 25(10): 1121-1127.

Ohnishi A, Oda Y, Hayakawa Y, 2001. Characterization of receptors of insect cytokine, growth-blocking peptide, in human keratinocyte and insect Sf9 cells. *J. Biol. Chem.*, 276(41): 37974-37979.

Okada M, Natori S, 1985. Primary structure of sarcotoxin I, an antibacterial protein induced in the hemolymph of *Sarcophaga peregrina* (flesh fly) larvae. *J. Biol. Chem.*, 260(12): 7174-7177.

Pan MH, Xiao SQ, Chen M, Hong XJ, Lu C, 2007. Establishment and characterization of two embryonic cell lines of *Bombyx mori*. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.*, 43(2): 101-104.

Sorkin A, von Zastrow M, 2009. Endocytosis and signalling: intertwining molecular networks. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 10(9): 609-622.

Strand MR, Hayakawa Y, Clark KD, 2000. Plasmatocyte spreading peptide (PSP1) and growth blocking peptide (GBP) are multifunctional homologs. *J. Insect Physiol.*, 46(5): 817-824.

Stroschein-Stevenson SL, Foley E, O'Farrell PH, Johnson AD, 2006. Identification of *Drosophila* gene products required for phagocytosis of *Candida albicans*. *PLoS Biol.*, 4(1): e4.

Tsuzuki S, Ochiai M, Matsumoto H, Kurata S, Ohnishi A, Hayakawa Y, 2012. *Drosophila* growth-blocking peptide-like factor mediates acute immune reactions during infectious and non-infectious stress. *Sci. Rep.*, 2: 210.

Wang F, Herzig C, Ozer D, Baldwin CL, Telfer JC, 2009. Tyrosine phosphorylation of scavenger receptor cysteine-rich WC1 is required for the WC1-mediated potentiation of TCR-induced T-cell proliferation. *Eur. J. Immunol.*, 39(1): 254-266.

Yu XQ, Prakash O, Kanost MR, 1999. Structure of a paralytic peptide from an insect, *Manduca sexta*. *J. Pept. Res.*, 54(3): 256-261.

Zhou Y, Wu S, Wang H, Hayakawa Y, Bird GS, Shears SB, 2012. Activation of PLC by an endogenous cytokine (GBP) in *Drosophila* S3 cells and its application as a model for studying inositol phosphate signalling through ITPK1. *Biochem. J.*, 448(2): 273-283.

（责任编辑：赵利辉）